

令和元年9月5日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18901

研究課題名(和文) マウスにおいて血糖降下作用を示すステロイド配糖体の探索とメカニズムの研究

研究課題名(英文) Research on steroidal glycosides with anti-metabolic syndrome activity in vivo

研究代表者

松尾 侑希子 (Matsuo, Yukiko)

東京薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：70434016

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：メタボリックシンドロームの治療に有効なサポニン系化合物の探索を目的として、天然物ライブラリーを中心としたサポニンの血糖降下作用および血清トリグリセリド低下作用を、マウスを用いて評価した。3年間の研究の結果、数種のトリテルペン配糖体に活性を見出した。特にトリテルペンの cymbopogonol およびトリテルペン配糖体の scillascilloside D-2 は高脂肪食負荷マウスの血清トリグリセリドの低下作用のメカニズムとして、膵リパーゼ阻害活性が関与することが示された。さらに漢方薬の血糖値への影響の評価や、マウスの血糖測定を簡便に実施するための新たな評価系の検討も行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生活習慣の乱れによる内臓脂肪蓄積は、肥満、糖尿病等を惹起させ、メタボリックシンドロームにつながる。近年、伝承的薬用植物エキスの抗高血糖の活性成分が配糖体成分のサポニン類であることが報告され、治療薬のシーズとして期待されている。本研究ではユリ科植物から単離したサポニン系化合物に、マウスの血清トリグリセリドの上昇を抑制する作用および血糖値上昇を抑制する作用があることを明らかにした。またトリテルペン配糖体のリパーゼ阻害活性に関する構造活性相関を示した。これらの基礎研究の成果によりサポニンのメタボリックシンドローム治療薬としての可能性を広げることを達成した。

研究成果の概要(英文)：To discover natural products with anti-metabolic syndrome activity, saponins from Liliaceae plants were evaluated in vivo. As a result, cymbopogonol, a triterpene from *Cymbopogon citratus*, and scillascilloside D-2, a triterpene glycoside isolated from *Scilla peruviana* bulbs, inhibited pancreatic lipase activity in a dose-dependent manner and decreased serum triglyceride levels in normal mice fed a high-fat diet. Furthermore, some triterpene glycosides from library decreased blood glucose levels in KK^{AY} mice.

研究分野：医歯薬学

キーワード：サポニン トリテルペン配糖体 メタボリックシンドローム *Scilla peruviana* 血糖値 血清トリグリセリド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖尿病の経口治療薬の進歩は目覚ましく多様な薬剤が登場しているが、高齢者や腎機能が低下した患者への投与は難しく、また糖尿病は認知症の促進要因との指摘もあることから新たな治療薬の開発が求められている。一般にステロイド配糖体などのサポニン類は親水性のため体内で吸収されにくく、安定性とその結合様式のため胃酸と消化酵素に耐性がある。よってステロイド配糖体は消化管下部まで届き、腸内細菌によりアグリコンと糖部に代謝された後、アグリコンが吸収される。これまで配糖体成分の糖鎖部分は体内での活性発現に関与しないとされてきた。近年、ユリ科アマドコロ *Polygonatum odoratum* 由来のステロイド配糖体が膵臓摘出ラットにおいて、インスリン分泌量を変えずにインスリン抵抗性を改善することが報告された[Choi, S. B., et al.; *Biosci. Biotech. Biochem.*, **66**, 2036-2043 (2002)]。さらにステロイド配糖体の代謝はアグリコンと糖鎖が完全に分解されるだけでなく、糖鎖構造が部分的に分解・転移して種々の代謝物が産生していくという報告がされ、例として三糖からなるステロイド配糖体 pseudoprotodiosin が腸内細菌によりラムノースの転移とアグリコンの変換を繰り返してジオスゲニンへと代謝されていくことが発見された[Tang Y.-N., et al.; *J. ethnopharmacol.*, **165**, 127-140 (2015)]。一方で食品安全委員会はハマビシ科ハマビシ *Tribulus terrestris* を含むサプリメントの安全性に注意喚起を発表した[健康食品に関する危害情報 (150807) https://www.fsc.go.jp/kigai_jyoho/]。 *T. terrestris* はステロイド配糖体を含有しており、 *T. terrestris* を経口投与した正常マウスと糖尿病マウスにおいて、血清グルコースがそれぞれ 26.3 %、40.7 % 低下した報告がある[Li, M., et al.; *J. Chinese medicinal materials*, **25**, 420-422 (2002)]。このようにステロイド配糖体は *in vivo* でも活性が発現するため、複雑な糖鎖が段階的に代謝されるのであれば糖鎖構造が活性に関与する可能性がある。しかし上記の研究は主にステロイド配糖体を多く含む植物の抽出エキスを使った実験であり、今後の発展的研究にはステロイド配糖体の単一化合物を扱った活性評価が求められている。

2. 研究の目的

申請者はこれまでに 50 種以上のサポニン類(ステロイド配糖体、トリテルペン配糖体)を単離・構造決定し、化合物ライブラリーを構築した。本研究では、この中から細胞毒性を示さないサポニンをマウスに経口投与し血糖降下作用を評価する。このスクリーニングにより活性が認められたサポニンについては、新たにマウスに経口投与して血清または血漿を取り出し、これらのメタボリックシンドローム関連因子を各種キットを使って測定する。最終的には *in vivo* で活性を示したサポニンのマウス線維芽細胞 3T3-L1 における脂肪細胞分化誘導への作用を評価し、メタボリックシンドローム治療薬をめざしたサポニンの基礎研究を達成する。

3. 研究の方法

糖負荷マウスを使った血糖値降下作用の評価

ステロイド配糖体やトリテルペン配糖体のライブラリーのうち、細胞毒性を示さないサンプルを正常マウスおよび 2 型糖尿病モデル(kkAy)マウスに単回経口投与し、スクロース負荷後 0, 30, 60, 120 分までのそれぞれの血糖値を評価した。血糖値の測定はマウスの尾静脈から行うのでほとんど痛みを与えない。

膵リパーゼ活性試験

ブタ膵リパーゼを基質 (BALB) を水解してジメルカプロール (BAL) を生成させた。生成した BAL に発色液 (DTNB) を添加し、5-チオ-2-ニトロ安息香酸 (TNB) アニオンを生成した。反応停止液を加え、反応混液の呈色を吸光度で測定しリパーゼ活性を検出した。

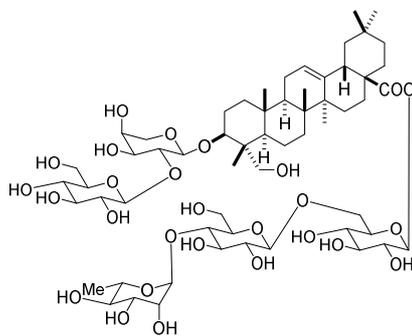
マウス線維芽細胞 3T3-L1 細胞に対する作用の評価

3T3-L1 細胞 (JCRB 細胞バンクより購入) を 10% FCS-DMEM で培養し、48 時間後に細胞が confluent になったらインスリンを含む誘導用培地に交換して分化誘導を開始した。ステロイド配糖体を分化誘導開始 30 分前から分化誘導開始 96 時間後まで培地に添加し、8 日後に分化の程度をコントロールと比較した。分化の程度は脂肪細胞を Oil Red O で染色して形態学的に測定した。

4. 研究成果

(1) 化合物ライブラリーのサポニンの血糖降下作用

ユリ科 *Caulophyllum thalictroides*, *Chionodoxa luciliae* およびセリ科 *Centella asiatica* 由来のトリテルペン配糖体 10 種をスクリーニングした結果、下記のトリテルペン配糖体が *kkAy* マウスで血糖値降下作用を示した。またインスリン抵抗性を改善する傾向が認められた。ICR マウスでは活性を示さなかった。



(2) *Cymbopogon citratus* のトリテルペンの血糖降下作用および血清トリグリセリド低下作用

C. citratus の MeOH 抽出エキスおよび 50%MeOH 溶出画分が血糖降下作用を示した。50%MeOH 溶出画分からはフラボノイド C-配糖体を単離し、血糖降下作用の活性成分であることが示唆された。一方でトリテルペンの *cymbopogonol* には高脂肪食負荷マウスの血清トリグリセリドの低下作用が認められた。さらにメカニズムとして腓リパーゼ阻害活性が関与することが示された。

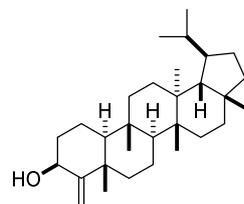
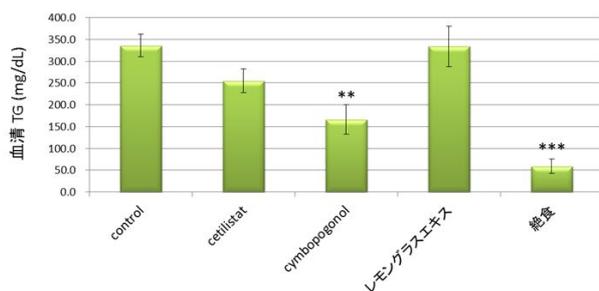
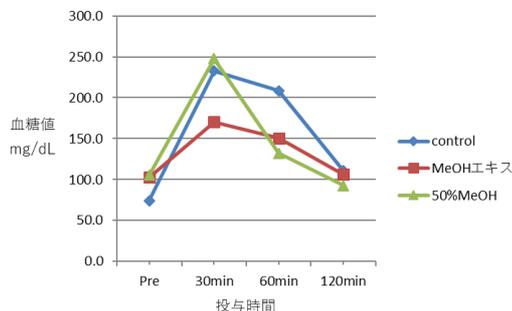
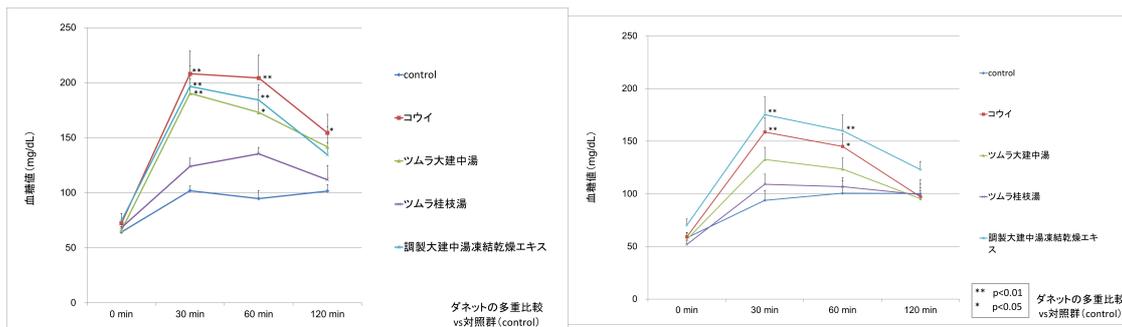


Fig. 4. *Cymbopogonol* とレモングラスエキスの血清 TG 吸収抑制効果

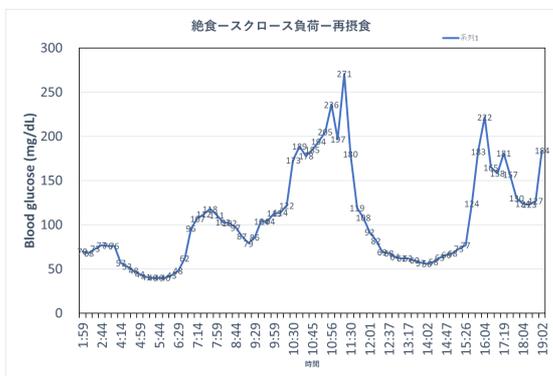
平均値±標準誤差 (n=5). 血清 TG について Dunnett の多重検定比較を実施した.
[*** p < 0.000 vs. control, ** p < 0.001 vs. control]

(3) 漢方薬 大建中湯に含まれる生薬コウイの血糖値への影響の評価

大建中湯(エキスおよび煎じ薬)および生薬コウイ単独投与の血糖値への影響を評価した。その結果、ICRマウスにおいて有意な血糖値の上昇は認められなかった。一方で、KK-Ayマウスでは大建中湯製剤投与後30分で血糖値が有意に上昇したことから、糖尿病患者が同製剤を服用する際には注意を払うべきであることが示唆された。



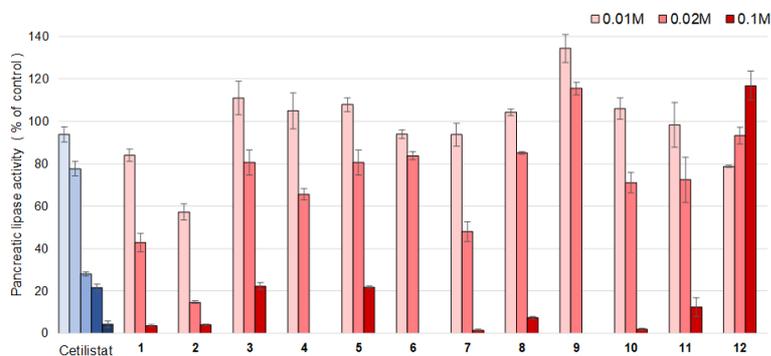
(4) 血糖値の経時変化の自動測定の検討

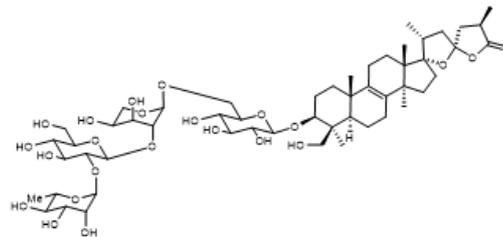
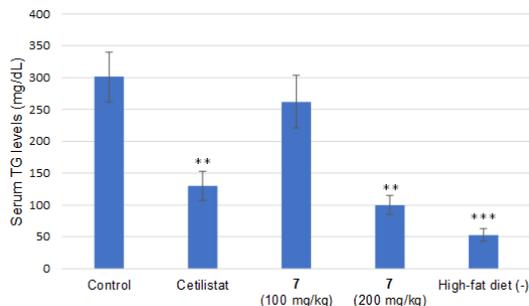
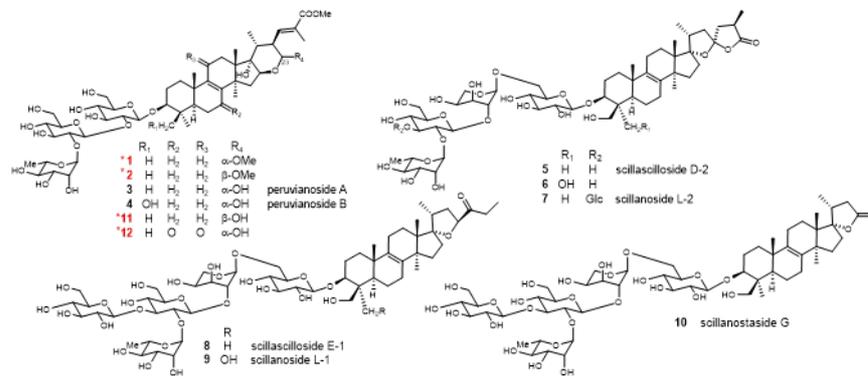


医療用の自動血糖測定システムを応用して、マウスの血糖値を最大10日間測定することに成功した。本機を用いた測定値は、尾静脈からの測定値よりも、わずかに高めに測定されていた。今後は漢方薬の自由摂取を長期間行い、血糖値の経時的な変化を自動で測定する予定である。

(5) *Scilla peruviana* のトリテルペン配糖体の血清トリグリセリド低下作用

S. peruviana の鱗茎から4種の新規トリテルペン配糖体を含む計12種の化合物を単離し、それらの構造を明らかにした。単離化合物の膵リパーゼ阻害活性を評価し、アグリコンの修飾および糖鎖の違いが活性に関与することを見出した。scillascillosideD-2 (7) はマウスの高脂肪食負荷による血清トリグリセリドの上昇を濃度依存的に抑制した。





7

以上、メタボリックシンドロームの治療に有効なサポニン系化合物の探索を目的として、天然物ライブラリーを中心としたサポニンの血糖降下作用および血清トリグリセリド低下作用を、マウスを用いて評価した。3年間の研究の結果、数種のトリテルペン配糖体に活性を見出した。さらに漢方薬の血糖値への影響の評価や、血糖測定を簡便に実施するための新たな実験系の検討も行った。一方で、マウスの血清または血漿を用いてメタボリックシンドローム関連因子を測定する予定であったが、現在もポジティブコントロールや生体試料の後処理などの条件設定を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Matsuo Y., Kubota A., Masimo R., Fukaya H., Inaba N., Mimaki Y., Cymbopogonol from *Cymbopogon citratus* and its biological activity. *Shoyakugaku Zasshi*, **71**, 98-99 (2017). 査読あり

Matsuo Y., Matsumoto K., Inaba N., Mimaki Y., Daisaikoto inhibits pancreatic lipase activity and decreases serum triglyceride levels in mice. *Biol. Pharm. Bull.*, **41**, 1485-1488 (2018). 査読あり

Kuroda M., Kubo S., Masatani D., Matsuo Y., Sakagami H., Mimaki Y., Aestivalosides A-L, twelve pregnane glycosides from the seeds of *Adonis aestivalis*. *Phytochemistry*, **150**, 75-84 (2018). 査読あり

Watanabe K., Mimaki Y., Fukaya H., Matsuo Y., Cycloartane and Oleanane Glycosides from the Tubers of *Eranthis cilicica*. *Molecules*, **24**, 69-81 (2019). 査読あり

〔学会発表〕(計8件)

松尾侑希子,窪田彩那,真下涼,深谷晴彦,稲葉二郎,三巻祥浩,レモングラスより単離された cymbopogonol の構造と生物活性について,第60回 香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会,2016年

松尾侑希子,稲葉二郎,三巻祥浩,大柴胡湯のリパーゼ阻害活性,第33回年会 和漢医薬学会学術大会,2016年

松尾侑希子, 稲葉二郎, 三巻祥浩, 大柴胡湯のリパーゼ阻害活性(2), 日本薬学会 第 137 年会, 2017 年

Yukiko Matsuo, Kenya Matsumoto, Niro Inaba, and Yoshihiro Mimaki, Daisaikoto, a Japanese traditional medicine used to treatment obesity, inhibits pancreatic lipase activity, 25th International Conference of FFC (国際学会), 2018 年

野崎智椰, 中川実香, 松尾侑希子, 深谷晴彦, 稲葉二郎, 三巻祥浩, 生薬ゴシユユの生活習慣病治療薬のシーズ探索研究, 第 62 回 日本薬学会関東支部大会, 2018 年

中川実香, 大友佳苗, 松尾侑希子, 三巻祥浩, ユリ科植物の化学成分(89) *Scilla peruviana* の化学成分とリパーゼ阻害活性, 第 65 回 日本生薬学会, 2018 年

米倉萌笑, 椎崇, 松尾侑希子, 黒田明平, 稲葉二郎, 三巻祥浩, 漢方薬中の生薬成分に関する研究(10) コウイ(膠飴)配合漢方薬中の糖類の定量と大建中湯の血糖値への影響, 第 65 回 日本生薬学会, 2018 年

椎 崇, 米倉萌笑, 松尾侑希子, 黒田明平, 稲葉二郎, 三巻祥浩, 漢方薬中の生薬成分に関する研究(11) - 大建中湯の糖類の定量と KK-Ay マウスの血糖値への影響について - , 第 28 回 日本医療薬学会年会, 2018 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者 なし

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2) 研究協力者 なし

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。